

# Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-515973

(P2002-515973A)

(43) 公表日 平成14年5月28日 (2002.5.28)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

データベース (参考)

G 0 1 N 33/574

G 0 1 N 33/574

E

33/53

33/53

M

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願平9-527625  
 (86) (22) 出願日 平成8年12月20日 (1996.12.20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成9年9月30日 (1997.9.30)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 2 0 7 2 7  
 (87) 国際公開番号 W O 9 7 / 2 8 4 5 0  
 (87) 国際公開日 平成9年8月7日 (1997.8.7)  
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 1 0 , 8 5 6  
 (32) 優先日 平成8年1月30日 (1996.1.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 6 9 9 , 6 7 8  
 (32) 優先日 平成8年8月14日 (1996.8.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 エグザクト サイエンス コーポレイ  
 ション  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 01754, メイナード, グレート ロード  
 63  
 (72) 発明者 ラビデウス, スタンリー エヌ.  
 アメリカ合衆国 ニューハンプシャー  
 03110, ベッドフォード, オールド エバ  
 ーグリーン ロード 12  
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糞便サンプルから結腸ガンを検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、糞便サンプルのような不均一な細胞サンプルにおけるガン細胞または前ガン細胞の亜集団の存在をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、ガン細胞および前ガン細胞由来の細胞破片が、結腸において糞便が形成される際に、糞便の長軸方向の筋上のみ沈積するという認識を利用する。従って、本発明の方法は、結腸細胞により流出される任意の細胞破片がサンプル中に得られることを確実にするために、代表的なサンプル (例えば、糞便の横断サンプル) を得る工程を包含する。

## 【特許請求の範囲】

1. 患者における結腸直腸のガン病巣または前ガン病巣の存在をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

a) 該患者より排泄された糞便の少なくとも1つの横断面部分を含むサンプルを得る工程；および

b) 該病巣から該排泄された糞便に流出された細胞または細胞破片の存在を示唆する特徴をサンプル中で検出するためのアッセイを行う工程；  
を包含する方法。

2. 患者における結腸直腸のガン病巣または前ガン病巣の存在をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

a) 該患者より排泄された糞便を得る工程；

b) 該糞便から横断面部分を取り出す工程；および

c) 該病巣から該排泄された糞便に流出された細胞または細胞破片の存在を示唆する特徴をサンプル中で検出するために、該横断面部分についてアッセイを行う工程；  
を包含する方法。

3. 前記アッセイが、前記病巣を含む形質転換された細胞のクローン集団由来の破片を検出する、請求項1に記載の方法。

4. 前記アッセイが、前記細胞の存在を示唆する形質転換された細胞により発現されるタンパク質を検出する、請求項3に記載の方法。

5. 前記アッセイが、前記細胞の存在を示唆するDNAの特徴を検出する、請求項3に記載の方法。

6. 工程(b)の前に、前記部分を生理学的に適合可能な緩衝液に均一化する工

程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

7. 前記生理学的に適合可能な緩衝液が、界面活性剤およびプロテイナーゼを含有する、請求項6に記載の方法。

8. 前記アッセイが、前記病巣から流出されたガン胎児性抗原の存在を検出する、請求項1に記載の方法。

9. 前記アッセイが、前記サンプルを、前記破片の存在に特有な分子に特異的に結合する抗体に曝す工程を包含する、請求項1に記載の方法。

10. 前記DNAの特徴が変異である、請求項5に記載の方法。

11. 前記変異が、ヘテロ接合性の消失およびマイクロサテライトの不安定性からなる群から選択される、請求項10に記載の方法。

12. 前記特徴が、腫瘍抑制対立遺伝子における欠失を含む、請求項10に記載の方法。

13. 前記アッセイが、前記サンプル中の細胞の亜集団において変異することが知られているか、または推測される第1の対立遺伝子の数 $X$ と、該サンプル中の細胞の亜集団において変異しないことが知られているか、または推測される第2の対立遺伝子の数 $Y$ との間で、該サンプルにおいて差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、統計的有意差の存在は、該サンプル中の細胞の亜集団における変異およびガン病巣または前ガン病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項1に記載の方法。

14. 前記アッセイが、前記サンプル中の標的腫瘍抑制対立遺伝子の数と、該サンプル中のガンに関連しない対照対立遺伝子の数との間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、統計的有意差の存在は、該サンプル中の細胞の亜集団における該標的腫瘍抑制対立遺伝子の欠失およびガン病巣または前ガン病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項1に記載の方法。

15. 前記特徴が、多型遺伝子座を包含するヘテロ接合性の消失を含む、請求項5に記載の方法。

16. 前記アッセイが、以下の工程：

a) 前記生物学的サンプルにおける多型遺伝子座での母系対立遺伝子の量を検出する工程；

b) 該生物学的サンプルにおける該多型遺伝子座での父系対立遺伝子の量を検出する工程；および

c) 該母系対立遺伝子の量と該父系対立遺伝子の量との間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、

統計的有意差の存在は、該生物学的サンプル中の細胞の亜集団における該多型遺伝子座での欠失および病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項13に記載の方法。

17. 陽性のアッセイ結果を示唆する患者の結腸の視覚的試験を行うさらなる工程を包含する、請求項1に記載の方法。

18. 前記少なくとも1つの横断面部分が、患者により排泄された完全な糞便を含む、請求項1に記載の方法。

19. 集団における結腸直腸ガンの罹患率を減少させるための方法であって、以下の工程：

a) 患者により排泄された糞便の少なくとも1つの横断面部分を含むサンプルを得る工程；

b) 病巣から該排泄された糞便に流出された細胞破片の存在を該サンプル中に検出するためのアッセイを行う工程；および

c) 病巣の存在を検出するための該アッセイにおいて陽性の結果を示す患者の、結腸の視覚的試験を行う工程；  
を包含する、方法。

20. 検出された病巣を外科的に切除するさらなる工程を包含する、請求項19に記載の方法。

21. 前記アッセイが、該病巣を含む形質転換された上皮細胞のクローン集団から流出された破片部分におけるDNAの消失を検出する、請求項19に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 糞便サンプルから結腸ガンを検出する方法

## 発明の分野

本発明は、患者における結腸ガンの早期検出のための方法、およびより詳細には、患者がガン病巣または前ガン病巣を有する場合、サンプルが診断的に関連した情報を含む可能性を確実にするため、または増大させるために結腸ガンの検出のための糞便サンプルを調製する方法、および糞便サンプルの分析方法に関する。

## 発明の背景

糞便サンプルは、しばしば、医学的診断分析のために調製されなければならない。糞便サンプルは、寄生虫感染、細菌感染、またはウイルス感染から炎症性腸疾患および結腸直腸ガンにわたる医学的状态を診断するのを助けるために分析され得る。

結腸直腸ガンは、西洋社会における主な死亡原因である。しかし、診断が早ければ、ガン組織の外科的除去により効果的に処置され得る。結腸直腸ガンは、結腸直腸上皮内に生じ、そして典型的には、発達の初期段階の間は広範に血管化しない（それゆえ、非侵襲的である）。結腸直腸ガンは、結腸または直腸の上皮裏打ちにおける単一の変異細胞のクローン拡大から生じると考えられる。高度に血管化した、侵襲的であつ最終的に身体全体に広がる転移性のガンへの移行は、通常10年以上かかる。ガンが侵襲前に検出される場合、ガン組織の外科的除去は有効な治療である。しかし、結腸直腸ガンは、しばしば臨床的徴候（例えば、痛みおよび黒いタール状の糞便）の発現に際してのみ検出される。一般に、このような徴候は、疾患が十分に確立した場合、しばしば、転移が生じた後にのみ現れ、そしてガン組織の外科的切除の後でさえも患者の予後は乏しい。それゆえ、結腸直腸ガンの早期検出は、検出がその罹患率を著しく減少させ得ることにおいて重要である。

内視鏡検査のような侵襲的診断方法は、潜在的にガン性の腫瘍（例えば、ポリープ）の直接的で視覚的な同定、除去、および生検を可能にする。内視鏡検査は

高価であり、不快であり、本質的に危険が伴い、それゆえ、結腸直腸ガンを有する個体を同定するために集団をスクリーニングするための実用的な道具ではない。結腸直腸のガンまたは前ガンの存在を示唆する特徴の糞便サンプルの非侵襲的分析は、早期診断のための好ましい代替法であるが、この目的を確実に達成する公知の診断方法は、利用可能でない。

現在の非侵襲的診断方法は、糞便の潜血の存在について、またはガン胎児性抗原の上昇レベルについて糞便サンプルをアッセイする工程を含む。これらは両方とも結腸直腸ガンの存在を示唆する。さらに、分子生物学における最近の発展は、結腸直腸ガンの存在に関連し、そしてこの存在を示唆するDNAの変異または変化する範囲の存在を検出する大きな可能性のある方法を提供する。このような変異の存在は、結腸直腸ガンの初期段階の間の糞便サンプル中に見出されるDNA中に理論上検出され得る。しかし、糞便は、細胞の不均一な集団をもたらす、患者、微生物、および食物由来の細胞および細胞破片を含む。このことが、小さな特定の亜集団の検出を、確実に検出することを不可能にしている。

当該分野において記載された結腸直腸ガンについての糞便診断アッセイは、典型的に、排泄された糞便の無作為にサンプリングされた部分から調製されたサンプルで行われる。しかし、このような方法によって調製されたサンプルは、たとえば、結腸直腸のガンまたは前ガンを有する患者により排泄された糞便から調製された場合であっても、結腸直腸のガンまたは前ガンの存在を示唆する特徴を再現的に与えない。従って、当該分野においては、結腸直腸のガンまたは前ガンを有する患者より排泄された糞便から調製されたサンプル中のガン性物質または前ガン物質の存在を示唆する特徴を再現的に検出する、結腸直腸ガンまたは前ガンの早期診断方法が必要とされている。このような方法が、本明細書中に提供される。

#### 発明の要旨

現在、細胞および細胞破片は、結腸上皮細胞から形成中の糞便の上に、糞便の長さに沿った長軸方向の「筋 (stripe)」の物質として流出されることが認識されている。流出された物質は、図1 (「C」と称する) に示すように、この長軸

方向の筋に制限される。この認識に基づいて、出願人らは、診断試験のための糞便サンプル調製は、サンプルが結腸を通過するにつれて糞便中に流出された何らかの細胞または細胞破片を含有することを確実にするために、代表的なサンプルを採取する工程を含まなければならないことを教示する。従って、本発明の方法は、患者により排泄された糞便の少なくとも1つの横断面部分を得て、そしてガンまたは前ガンを示唆し得る結腸を裏打ちする上皮細胞から流出された細胞または細胞破片の存在をサンプルにおいて検出するためのアッセイを行う工程を包含する。非常に頻繁に、このような細胞は、結腸に沿った異なる位置でのポリープあるいはガン病巣または前ガン病巣に由来する。本発明の目的のために、前ガン病巣は前ガン細胞を含み、そして前ガン細胞はガンに関連しそしてこのような細胞をガン性になりやすくする変異を有する細胞である。図1に示すように、横断面サンプルは、糞便の少なくとも1つの完全な円周（または完全な横断面部分を含む糞便部分）（例えば、冠状断面または矢尻状断面）を含むサンプルである。

好ましい実施態様において、本発明の方法は、患者より排泄された糞便の少なくとも1つの横断面部分を得る工程、および形質転換された細胞のクローン集団由来の破片を検出するためのアッセイを行う工程を包含する。形質転換された細胞は、例えば、1つ以上の変異（本出願の目的のために、変異は、DNAの欠失、置換、付加、改変、挿入、または再編成である）を有する細胞のクローン亜集団を包含する。本発明の好ましい方法は、このような形質転換された細胞の特徴を検出する工程を包含する。このような特徴は、例えば、変異、形質転換された細胞において独特にまたは変化した量で発現されるタンパク質、および血液を含む。本発明の特に好ましい方法は、糞便サンプルの少なくとも1つの横断面部分を得る工程、およびサンプル中の細胞のクローン亜集団の存在を示唆するDNAの特徴を検出するためのアッセイを行う工程を包含する。クローン亜集団は、例えば、p53腫瘍抑制遺伝子中に変異を有する、例えば、ガン細胞または前ガン細胞の亜集団であり得る。本発明の方法によって検出される細胞のクローン亜集団はしばしば、欠失に包含される、遺伝子（単数または複数）を無効にするヘテロ接合性の消失をもたらすDNAの大規模な消失により特徴付けられる。

本発明の方法はまた、糞便の代表的な（すなわち、横断面）サンプルを得る工

程、および糞便を緩衝液（例えば、界面活性剤およびプロテイナーゼ、ならびに必要に応じてDNaseインヒビターを含有する緩衝液）中に均一化する工程を包含する。

本発明の方法において、糞便の少なくとも1つの横断面部分について行うアッセイは、結腸を裏打ちする細胞から流出されたガン胎児性抗原の上昇したレベルの存在を検出するためのアッセイであり得る。このようなアッセイはまた、潜血の存在を検出する工程を包含し得る。しかし、本発明の方法は、好ましくは、サンプルを、ガンに潜在的に関連する変異を有する細胞の亜集団を含む細胞から流出された細胞破片に特徴的な分子に特異的に結合する抗体に曝すアッセイを包含する。

本発明の方法は、特にかつ最も好ましくは、代表的な糞便サンプル中の形質転換された細胞の亜集団を示唆するDNAの特徴を検出するために有用である。DNAの特徴は、例えば、ヘテロ接合性の消失、マイクロサテライトの不安定性などを包含する変異であり得る。本発明の方法におけるDNAの特徴についてのアッセイは、代表的な糞便サンプル中に細胞の亜集団が変異していることが知られているか、または推測される、第1の対立遺伝子の数Xと、サンプル中で変異していないことが知られているか、または推測される対立遺伝子の数Yとの間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し得る。統計的有意差は、サンプル中の細胞の亜集団における変異およびガンの潜在的な存在を示唆する。本発明の1つの実施態様において、腫瘍抑制遺伝子の数とガンに関連しない遺伝子の数との間の差異が比較され、この数における統計的有意差は腫瘍抑制遺伝子における変異を示唆する。

本発明の方法の実施に有用なアッセイはまた、多型ヌクレオチドを含む領域における欠失または他の変異の存在を検出するためのアッセイを包含する。このようなアッセイにおいて、母系対立遺伝子および父系対立遺伝子に存在する多型ヌクレオチドの数が決定される（ここで、患者は、多型ヌクレオチドについてヘテロ接合性である）。母系対立遺伝子および父系対立遺伝子における多型ヌクレオチドの数の間の統計的有意差は、2つの対立遺伝子の1つにおける欠失の存在を示唆する。



本発明の方法は、典型的に、サンプル調製および細胞または細胞破片の特徴についてのアッセイの後に、ポリープまたは他の病巣が実際に存在するか否かを決定するための結腸の視覚的試験を包含する。最終的に、ガン組織または前ガン組織の拡散を防ぐために、異常組織の外科的切除を行い得る。

従って、本発明の方法は、不均一なサンプル（例えば、糞便サンプル）中のガン細胞または前ガン細胞の亜集団の存在についてスクリーニングするための手段を提供する。本発明の方法は、結腸上皮の病巣に関連する罹患率および死亡率を減少させる。さらに、本発明の方法は、現在当該分野で利用可能な方法よりも正確なスクリーニング方法を包含する。なぜなら、現在の方法は、ガン細胞または前ガン細胞が形成中の糞便の表面の一部分上またはその中にのみ破片を流出するという観察を利用しているからである。本発明の方法は、糞便の完全な円周にわたって確実にアッセイし、それにより異常が存在している場合にそれを検出する可能性が増加する。本発明のさらなる局面および利点は、その以下の詳細な説明に含まれる。

#### 図面の説明

図1は、形成された糞便を表し、そして糞便の完全な円周由来の物質を含む種々の横断面を示す柱体の図である。「A」と標識された断面は、典型的な冠状断面であり、そして「B」と標識された断面は、典型的な矢尻状断面である。「C」と標識された細片は、長軸方向の筋に沈積した、ガン組織から流出された物質を表す。

図2は、糞便サンプルを含むための容器の模式図である。

図3は、マルチオリフィスインピーダンスカウンター (multi-orifice impedance counter) の模式図である；ここで、参照番号1は、カラムを通る流れの方向を示す；参照番号2は、カラムの下方に物質を押しこむためのプランジャー手段を示す；参照番号3および4は、異なるサイズのハイブリダーゼーションピースである；参照番号5は、所望しない粒子を抽出するための随意的フィルターである；参照番号6は、微分インピーダンス (differential impedance) を測定するためのオリフィスの配列を示す；そして参照番号7は回収チャンバーである。

図4は、単一塩基多型の検出のために有用なプライマーを示す図である。

#### 発明の詳細な説明

本発明による方法は、このような集団が患者の結腸に沿った任意の部位に存在する場合、ガン細胞または前ガン細胞のクローン集団から流出された細胞または細胞破片を再現的に含む、糞便サンプルの調製のために有用である。次いで、これらのサンプルは、再現性が高くそして正確な方法でガンを示唆する特徴を検出するためのアッセイを実施するために使用される。このような方法は、これらが患者により排泄された糞便由来の少なくとも1つの横断面サンプルを取り出すことを教示するので、従来技術を超える改善を提供する。少なくとも1つの横断面サンプルを得なければならないとの認識がなければ、ガンまたは前ガンの亜集団の細胞が存在しても、それを含むサンプルを再現的に得るための手段は存在しない。

当該分野で記載された方法は、寄生虫、細菌、およびウイルスによる感染とは異なり、結腸ガン、特に初期段階の結腸ガンの存在を示唆する特徴が排泄された糞便の特定の部分にのみ見出されることを認識しない。糞便のサンプリングした部分が、初期段階のガン組織から排泄された細胞および細胞破片をたまたま含む部分を含有しない場合、診断アッセイは、たとえ均一化したとしても、信頼できる方法で結腸直腸ガンの存在を示唆する特徴を必ずしも検出し得るわけではない。すなわち、偽陰性の結果を生じる。

例えば、結腸を裏打ちする上皮において、または初期段階のガン病巣上に形成するポリープ由来の脱落細胞は、ポリープまたは病巣と接触する形成中の糞便部分にのみ脱落する。従って、初期段階の疾患において、形成中の糞便の表面層の小さな部分のみが脱落細胞を含有し、そしてこの部分がサンプル部分として採取されない場合、必ず、結腸ガンの徴候についてのアッセイは偽陰性の結果を生じる。結腸の解剖学および生理学の簡単な総説は、この現象の理解の助けとなる。

典型的な成人の結腸は、大体、6フィートの長さであり、約2～約3インチの直径を有する。多くの屈曲およびひだがその長さ全体に存在する。結腸は、結腸に侵入する液体状または半液体状の老廃物から水分を除去し、そして比較的固い糞便が、結腸の基部付近の3分の1で形成し始める。上皮細胞は結腸の管腔を裏

打ちし、そして管腔の表面は微細な陰窩内に組織化される。結腸直腸上皮細胞は、4～5日毎に置き換えられる。上皮細胞は、陰窩の基底で急速に分裂し、そして先端 (apices) へと移動する。ここで、細胞はアポトーシス (プログラム細胞死) を受けるようであり、そして細胞破片は管腔へ流出される。結腸直腸管腔の裏打ちは弾力性があり、そして管腔の直径は、任意の所定の時間で結腸を通る糞便の容量によって決定される。結果として、結腸を通過する形成中の糞便の表面は、管腔の上皮裏打ちと直接接触する。従って、流出された上皮細胞 (アポトーシスを受けたかもしれないし、受けてないかもしれない) および細胞破片は、結腸を通過するにつれて糞便の表面に取り込まれる。

従って、結腸直腸上皮ガン由来の細胞および細胞破片はまた、形成中の糞便に流出される。多くの結腸直腸ガンは、糞便が比較的固い結腸の領域で発達し、実際、このようなガンの約1/3が直腸において発達する。ガンの存在を示唆するマーカー (細胞、細胞破片、DNA、血液、およびガン胎児性抗原を包含する) は、糞便が結腸を通るにつれてガン組織と接触する形成中の糞便部分に流出される。糞便は比較的固いために、これらのマーカーは糞便の表面上またはその付近に残存する。ここでこれらは沈積し、そして糞便全体に均一に分散されない。糞便がガン腫瘍または前ガン腫瘍を通過するにつれて、腫瘍由来の物質は糞便に沿っているが、病巣を含むガン組織または前ガン組織と直接接触する糞便の円周の一部にのみ沈積される。従って、結腸直腸のガンまたは前ガンを患う患者により排泄された糞便は、ガン組織または前ガン組織に由来する診断上関連する物質の長軸方向の「筋」によって特徴付けられる。

結腸直腸のガンまたは前ガンを患う患者により排泄された糞便の完全な円周由来の物質を含まないサンプルは、ガン組織または前ガン組織に由来する物質を再現的に含まない。一般に、排泄された糞便の無作為な、非横断サンプル (「塗抹標本」) が、臨床台 (setting) において分析される。これらにおいて、脱落したガン細胞または前ガン細胞および細胞破片は、サンプルが、たまたま偶然に、細胞が脱落した結腸の領域と接触した糞便の部分を含まない限り、検出される可能性がない。

さらに、ガンは単一の変異細胞のクローン拡大によって典型的に発達し、そし

て疾患の初期段階（すなわち、外科的除去が有効な治療である時期）において、ガン病巣は、非常に小さく、そして結腸の円周の小さな弧の上にあり得る。従って、このような初期段階のガンに由来する物質は、非常に狭い筋（図1においてCと標識する）において糞便の上またはその中に流出される。その結果、初期段階の結腸直腸のガンまたは前ガンを患う患者により排泄された糞便の完全な円周を含まないサンプルは、偶然によってしか初期段階のガン状態または前ガン状態の存在を示唆する物質を含まない。しかし、結腸直腸ガンの早期検出は、効果的な外科的介入のために非常に重要である。本発明は、患者におけるガンまたは前ガンの存在を示唆する特徴の再現性のある早期検出のための方法を提供する。

図1に示すように、糞便の少なくとも1つの横断サンプル（糞便全体を含む）の分析は、任意の存在するガン細胞または前ガン細胞から流出された細胞および細胞破片の少なくとも一部（たとえ、小さな初期段階のガン組織または前ガン組織（例えば、小さなポリープ）から排泄されていても）が、分析されるべき糞便サンプル部分に存在することを確実にする。実際に、糞便サンプルの少なくとも1つの横断面を採取することは、たとえ、患者が結腸直腸のガンまたは前ガンを有している場合であっても脱落したガン細胞または前ガン細胞を含まない糞便部分を分析する可能性を防止する。

一旦、横断糞便サンプルが得られると、それは公知の方法により均一化されて細胞および細胞破片をサンプル全体に分配させ得る。次いで、サンプル中の細胞および／または細胞破片の存在を検出するために、ホモジネートまたはホモジネートの抽出物についてアッセイが行われる。アッセイは、組織学的細胞アッセイ、タンパク質のような形質転換に特有な分子の存在を検出するために設計された抗体に基づく免疫アッセイ（または他の形式）、または結腸直腸ガンを示唆する変異または遺伝的特徴を検出するためのDNAに基づくアッセイのいずれか1つまたはそれらの組み合わせであり得る。公知のアッセイプロトコル（本明細書中、または同時継続中の出願の出願番号[本出願と同日に出願した代理人の文書番号EXT-001]に開示されるプロトコル）、または今後開発されるアッセイが、本発明の実施に使用され得る。有用な公知のアッセイプロトコルの限定されない例は、米国特許第5,137,806号（選択されたDNA分子における配列の検出）、同第5,34

8,

855号（核酸配列についてのアッセイ）、同第5,512,441号（変異対立遺伝子の検出）、同第5,272,057号および同第5,380,645号（RFLP解析）、同第5,527,676号（p53遺伝子配列の検出）、同第5,330,892号（MCC遺伝子配列の検出）、同第5,352,775号（APC遺伝子配列の検出）、同第5,532,108号（DCC遺伝子配列の検出）、およびWO96/08514（ヒト結腸癌腫関連抗原に対するモノクローナル抗体）に開示されるプロトコルを包含する。これらのそれぞれの開示は、本明細書中に参考として援用される。あるいは、またはさらに、糞便の潜血についてのアッセイを、本明細書中に参考として援用される米国特許第4,333,734号および同第5,196,167号に報告されたように行い得る。本発明の文脈において有用なアッセイはまた、本明細書中に参考として援用される米国特許第5,380,647号に報告されるように、ガン胎児性抗原についてのアッセイを包含する。最後に、サンプルは、本明細書中に参考として援用される米国特許第4,857,300号に報告されるように、ガン細胞または前ガン細胞の存在を示唆する特徴を検出するための組織学的検査のために調製され得る。

少なくとも1つの横断面サンプルを得ることに関連して使用される任意のアッセイプロトコルの目的は、結腸鏡検査またはS字結腸鏡検査のようなその後の侵襲的診断手順のための候補を同定することである。従って、このアッセイは、明白に偽陰性が防止されるべきであるが、ガン病巣または前ガン病巣の存在を明確に検出する必要はない。試験プロトコルの目的は、サンプル中の莫大な量の細胞破片中に、通常、初期段階の形質転換と関連する変異を有するいくつかの細胞が存在するか否かを決定することではなく、むしろ、サンプルが変異細胞亜集団のクローン拡大を示唆する破片を含んでいるか否かを決定することである。最大の利益は、クローン的に拡大した細胞集団（すなわち、ガン病巣または前ガン病巣を含む、形質転換された結腸上皮細胞）の可能性のある存在を検出するために設計されたアッセイによりもたらされる。初期段階のガンまたは前ガンを検出する能力を有するアッセイは、本発明の方法において好ましい。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いるアッセイ、制限断片長多型（RFLP）、または核酸分析につい

ての他の方法は、直腸結腸のガンまたは前ガンの存在を示唆する公知のDNAの特徴を検出するために用いられ得る。細胞破片の量的検出についてのより正確な方

法（例えば、DNA断片またはセグメント）が本明細書中に記載される方法による横断面サンプルを分析するために用いられ得る。

好ましいアッセイは、ガンまたは前ガンの発達を示唆するDNAの特徴についてサンプルを調べる。しかし、本発明の方法で使用するためのアッセイは、臨床的に関連する形質転換組織から流出された任意の異常な細胞破片を検出し得る。従って、本発明の好ましい局面によれば、アッセイは、ヘテロ接合性の消失、マイクロサテライトの不安定性、または他の変異を受けた細胞の特徴の存在を検出するために用いられる。

以下の実施例は、本発明による方法の詳細を提供する。しかし、本発明の多くのさらなる局面、特に、実施されるべきアッセイに関しては、以下のそれらの詳細な説明を考慮すれば明らかとなる。

#### 実施例 1

##### 糞便サンプルの調製

サンプルを、サンプルが患者により排泄された糞便の少なくとも1つの横断面部分を含むように調製する。横断面部分を、図1に示すように、糞便を通して1つ以上の矢尻状または冠状断面を作製することにより、排泄された糞便から取り出す。取り出された部分は、糞便の完全な円周に由来する物質を含む。あるいは、糞便全体を使用し得る。この部分は、実施されるべきその後の診断アッセイを可能にするための十分な物質を含む。糞便は、好ましくは、試験施設に輸送されるのに十分小さい容器に排泄される。容器を、この容器が従来の方法で排泄された糞便を受けると、従来のトイレに適合させ得る。容器は、尿はメッシュまたはスクリーンを通過してトイレに入り得るが、糞便は保持されるように、十分な大きさおよび配置のメッシュまたはスクリーンを備え得る。さらに、容器は、糞便から横断面部分を取り出すための手段を備え得る。さらに、容器は、糞便サンプル中に存在する細菌を中和するための、均一化緩衝液または1つ以上の防腐剤（例えば、アルコール、高塩濃度の溶液、抗体、およびカオトロピック塩）を

導入するための手段を備え得る。均一化緩衝液は、生理学的に適合可能な緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水）であり得、そして20～100mM NaClまたはKClのような塩を含み得る。均一化緩衝液はまた、界面活性剤（例えば、1～10%

SDSまたはトリトン）および／またはプロテイナーゼ（例えば、プロテイナーゼK）を含み得る。緩衝液はまた、DNA分解酵素またはRNA分解酵素のインヒビターを含み得る。

容器は、トイレに合うように適合しているか、または単に排泄された糞便サンプルを受けるために適合しているかによらず、排泄された糞便サンプルおよびそれに添加された任意の溶液を含むため、そして臭気の発散を防ぐために十分な密封手段を備えるべきである。代表的な容器を図2に示す。図に示すように、容器は、便器2の上に直接配置される支持フレーム1を有する。支持フレーム1は、図2に示すように、サンプルの沈積のために一段高い位置に、または排泄された糞便を容器内に密封するために閉鎖位置（示さず）に配置され得る分節カバー3が取り付けられている。支持フレーム1は、さらに支持フレーム1の上部表面5から底部表面6を横切る中央開口部4を有する。底部表面6は、直接、便器2の上部表面7に連結する。支持フレーム1の底部表面6からの伸展物は、排泄された糞便を捕獲するための手段8である。手段8は、支持フレーム1にしっかりと取り付けられ得るか、または糞便の沈積の後の取り出しのために取り外し可能に取り付けられ得る。手段8は、排泄された糞便から少なくとも1つの横断面部分を取り出すためのさらなる手段を備え得る。好ましいサンプルのサイズは、少なくとも5～10g、または少なくとも5～10mlである。最小のサンプルサイズの存在を評価するための手段は、最小のサンプルサイズを示す物理的図表(physical diagram)を含み得る。あるいは、最小のサンプルサイズの存在を評価するための手段は、糞便サンプルの沈積に際する最小レベルに対する液体、または機械的装置の置換を含み得る。

一旦得られたら、横断糞便サンプルを適切な緩衝液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水）中で均一化する。均一化手段および均一化のための材料は、当該分野で一般に公知である。従って、特定の均一化方法は、当業者により選択され得、

そして用いられるべきアッセイに依存し得る。緩衝液は、界面活性剤、塩、プロテイナーゼ、DNA分解酵素およびRNA分解酵素のインヒビターを含み得る。緩衝液の組成は、実施されるべきアッセイのタイプに依存する。糞便の潜血アッセイが行われる場合は、緩衝液は、血液と反応して発色する（この発色の強度が測定さ

れ得る）化合物を含み得る。糞便の潜血の存在を検出するために有用な緩衝液は、当該分野で公知である。試験が特定のタンパク質の存在について実施される場合、緩衝液はこのような腫瘍を標識する抗原を分解し得るプロテイナーゼを含むべきでない。

DNAまたはRNAは、当該分野で公知の方法を用いて、ホモジネートから単離され得る。その後の試験は、単離されたDNAおよびRNAにおいて行われ得る。

#### 実施例 2

糞便サンプル中の結腸直腸ガンまたは前ガンの検出のための代表的な計数方法  
結腸直腸ガンまたは前ガン病巣の存在に関連するDNAの特徴を、例えば、以下の節で記載される方法を用いて、本発明に従って調製された糞便サンプルにおいて検出し得る。好ましくは、陽性の個体において慎重な内視鏡検査を行い、続いて任意の罹病組織の初期外科的摘出を行う。

##### A. 対照—標的

糞便サンプルを調製し、続いてp53腫瘍抑制遺伝子における欠失または他の変異を検出するために、本発明の方法を用いる。p53遺伝子は、正当な選択である。なぜなら、p53におけるヘテロ接合性の消失が、しばしば結腸直腸ガンと関連するからである。p53のDNAコード領域に対応するmRNA配列を、GenBank受託番号M92424として報告する。排泄された糞便サンプルの少なくとも横断面を、直前に記載されたように、本発明の方法に従って得、そして調製する。サンプルを、分析のためにさらに加工する必要はない。しかし、DNAまたはRNAを、必要に応じて、当該分野で公知の方法によってサンプルから単離し得る。本明細書中に参考として援用されるSmith-Ravinら、Gut, 36:81-86(1995)を参照のこと。

核酸を、例えば、制限消化により小さなフラグメントに剪断または切断し得る。生成される核酸フラグメントのサイズは、重要ではないが、以下に記載の限定



が与えられる。変異した疑いのある標的対立遺伝子（本実施例においては、p53）および対照対立遺伝子を選択する。対照対立遺伝子は、結腸ガンにおいて通常変異しないことが知られている任意の対立遺伝子であり得る。

コーディング鎖またはその相補物のいずれかの部分が検出され得る。例示のた

めに、p53のコーディング鎖および対照対立遺伝子の検出を、本明細書中に記載する。p53および対照対立遺伝子の両方に対する相補物は、アンチ相補オリゴヌクレオチドプローブ（単離プローブ）に対するハイブリダイゼーション、およびその後それにより形成された二本鎖の取り出しによって取り出される。一本鎖オリゴヌクレオチドの混合物から相補鎖を取り出す方法は、公知であり、そしてアフィニティークロマトグラフィーのような技術を含む。二本鎖DNAを一本鎖DNAに変換する際に（例えば、本明細書中に参考として援用される Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual(1989)を参照のこと）、サンプルを、サンプルから単離除去されるべき配列に相補的である結合単離プローブを充填したアフィニティークラムに通過させる。従来のカラムクロマトグラフィーは、相補物の単離に適切である。分析されるべきDNAをカラムに通過させる間に、相補的なヌクレオチドが結合された、セファロースまたは他の適切な物質を充填したアフィニティークラムを使用して、カラム内の相補的なDNAを単離し得る。Sambrookら、前出を参照のこと。あるいは、以下に詳細に議論するように、単離ビーズを、相補物を取り出すために用い得る。

相補鎖の除去後、p53対立遺伝子の少なくとも一部にハイブリダイズする第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび対照対立遺伝子の少なくとも一部にハイブリダイズする第2のオリゴヌクレオチドプローブを得る。プローブを、検出可能な標識（例えば、フルオレセイン）または検出可能な粒子で標識する。プローブごとに異なる標識が好ましい。しかし、例えば、サンプルが2つの別々のアリコートにおいてアッセイされる場合は、同一の標識が用いられ得る。プローブを、同一の標識を用いて、または異なる標識を用いて標識し得る。しかし、異なる標識が好ましい。

次いで、標識されたプローブを、ハイブリダイゼーション条件下でサンプルに

曝す。このような条件は、当該分野で周知である。例えば、本明細書中で参考として援用されるWallaceら, *Nucleic Acids Res.*, 6:3543-3557(1979)を参照のこと。異なって標識される(すなわち、異なる放射活性アイソトープ、蛍光手段、または異なるサイズのビーズによって、以下を参照のこと)第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブは、サンプルの単一のアリコートに適用される。プロ

ーブをハイブリダイゼーション条件下でサンプルに曝した後、サンプルを洗浄してハイブリダイズしなかったプローブを全て除去する。その後、ハイブリダイズしたプローブを、p53ハイブリッドおよび対照対立遺伝子ハイブリッドについて別々に検出する。標準を、バックグラウンドを確立するためおよび結果を平衡化するために使用し得る。さらに、異なる蛍光標識を用いる場合、プローブの数を、サンプル中の単一の蛍光事象の検出が可能なほど十分に希釈されたサンプル中で、異なる蛍光事象を計数することにより決定し得る。得られた結果の精度を確認するために、2連のサンプルを分析し得る。

検出されたp53の量と検出された対照対立遺伝子の量との間に、統計的に有意な差が存在する場合、その配列を変化させそしてプローブのハイブリダイゼーションを妨げるようにp53に変異が生じたか、またはp53を含むゲノム領域の少なくとも一部が結腸から脱落した細胞の亜集団から失われている、とみなされ得る。従って、患者は、結腸ガンを発達させる危険性があり得るか、または結腸ガンを発達してい得る。統計的有意性を、任意の公知の方法により決定し得る。例えば、Steelら, *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach* (McGraw, Hill, 1980)を参照のこと。統計的方法はまた、同出願人の特許出願である出願番号——(代理人記録番号EXT-001)に概説される。

p53変異の決定は、さらに診断するために、そして必要であれば、患者の症状を処置するために、医師がさらなる処置(例えば、内視鏡手順)を推奨するのを可能にする。以下の実施例は、ハイブリダイゼーション事象を直接定量するのを可能にする方法を例示する。

#### 1. 標的および対照のポリヌクレオチドの定量方法

ハイブリダイゼーションプローブと標的または対照との間の結合事象の増大定

量を、ハイブリダイゼーションプローブを粒子（例えば、ビーズ（ハイブリダイゼーションビーズ））に結合することにより達成される。サンプル中のポリヌクレオチド量の正確な定量測定を得るために、それぞれのビーズに単一のオリゴヌクレオチドプローブが付着するように、ハイブリダイゼーションビーズを構築する。

#### a. プローブ-ビーズ組み合わせの調製方法

単一のプローブを、大過剰のハイブリダイゼーションビーズを所定のタイプのオリゴヌクレオチドプローブ（すなわち、第1または第2のオリゴヌクレオチドプローブのいずれか）とインキュベートすることにより、ビーズに付着させる。ビーズへのプローブの結合は、親和性結合対を用いることにより達成される。例えば、ビーズを、アビジンまたはストレプトアビジンで被覆し得、そしてプローブを、ビーズへのプローブの効果的な結合のためにビオチンを用いて標識し得る。ビーズとプローブとの混合物を、100%のプローブがビーズに結合するように攪拌する。次いで、混合物を、マトリックス（例えば、プローブに相補的なオリゴヌクレオチドで被覆されたアフィニティーカラムまたはメンブレン）に曝す。プローブに付着したビーズのみが、マトリックスに接着し、残りは、洗い流される。次いで、結合したプローブを有するビーズが、プローブと相補物との間のハイブリダイゼーションを融解することにより、マトリックスから放出される。マトリックスへの曝露およびカラムの予備洗浄を多数繰り返すことにより、非特異的結合が減少する。さらに、露出したビーズ（すなわち、結合したプローブが存在しない）を、マトリックスに曝してプローブの非存在下でマトリックスに付着することが予測され得るビーズのバックグラウンド数を測定し得る。

上記のように、プローブに対して大過剰のビーズを用いることにより、非常に大多数の回収されたビーズが、1つの結合したプローブのみを有する。例えば、混合物が1000ビーズに対して1プローブの比率を有する場合、100万個に約1個のビーズのみが2つの付着されたプローブを有し、そして100万個に1個未満より少ないビーズが2個より多い付着したプローブを有すると予測される。従って、ハイブリダイゼーションビーズが、下記のような標的および対照ポリヌクレオ

チドの正確な定量を可能にするプローブとともに、効果的な1:1の比率で提供される。

下記の各アッセイについて、2つの異なるハイブリダイゼーションビーズを用いる。第1のハイブリダイゼーションビーズは、標的ポリヌクレオチド（例えば、p53対立遺伝子）の少なくとも一部分に相補的である単一の第1のオリゴヌクレオチドプローブに付着される。第2のハイブリダイゼーションビーズ（第1のハイブリダイゼーションビーズとは異なるサイズ）は、対照のポリヌクレオチド

（すなわち、サンプル中で変異していないことが知られているかまたは推測されるポリヌクレオチド）の少なくとも一部分に相補的である単一の第2のオリゴヌクレオチドプローブに付着される。

#### b. 標的および対照のポリヌクレオチドを定量するためのビーズの使用

DNAを、周知の方法により融解する（変性させて一本鎖DNAを形成させる）。例えば、本明細書中に参考として援用される、Gyllensteinら, Recombinant DNA Methodology II, 565-578(Wu編, 1995)を参照のこと。標的および/または対照のポリヌクレオチドを定量するために、コーディング鎖またはその相補鎖のいずれかを検出し得る。例示の目的のために、本実施例は、コーディング鎖の検出を想定する。

#### 2. 相補物の取り出し

標的ポリヌクレオチド（例えば、p53）および対照ポリヌクレオチドの一本鎖相補物を、標的または対照の相補物に相補的であるオリゴヌクレオチドプローブに結合させることにより、サンプルから取り出す。このようなプローブ（本明細書中では、単離プローブという）を、サンプルへのそれらの導入前に単離ビーズに付着させる。ビーズは、磁化され得る。従って、磁化された単離ビーズ（付着した単離プローブ（単数または複数）を有する）がサンプル中に導入される場合、付着した単離プローブは、標的または対照の相補物にハイブリダイズする（逆もまた同じ）。単離ビーズは、好ましくは、相補的な結合を飽和させるために、大過剰に導入される。一旦ハイブリダイゼーションが完了したら、サンプルに磁場をかけて磁化した単離ビーズをサンプルから引き出す（ハイブリダイズした相

補物を伴う場合、および伴わない場合のいずれの場合でも)。十分量の単離ビーズがサンプル中に導入されたと仮定すれば、単離ビーズを取り出すことにより、サンプルから全ての標的および対照の相補物が効果的に取り出される。

相補物の除去のための別の方法において、ビオチンで標識された過剰のオリゴヌクレオチドプローブを、ハイブリダイゼーション条件下で、融解または脱ハイブリダイズした（一本鎖の）サンプルに曝す。一旦ハイブリダイゼーションが完了したら、固定化したアビジンを含むカラムにサンプルを曝す。ビオチン標識したプローブを、遊離しているか相補物にハイブリダイズしているかにかかわ

らず、カラム上のアビジンに結合させる。検出されるべき標的および対照コーディング鎖を含む残りのDNAを、カラムに通す。上記のハイブリダイゼーションビーズの記載とは対照的に、相補物を取り出すためのビーズは、それぞれ多数の相補的なオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。

### 3. 標的および対照の定量

2セットのハイブリダイゼーションビーズを、上記のように調製する。第1のセットのハイブリダイゼーションビーズの各メンバー（この全ては互いに同一である）に、標的ポリヌクレオチド（すなわち、ガン病巣の細胞において変化したゲノムの部分）の少なくとも一部に相補的である単一のオリゴヌクレオチドプローブを付着させる。同一のハイブリダイゼーションビーズの第2のセットのそれぞれのメンバー（この全ては互いに同一であるが、しかし第1の組とは同一ではない）に、対照ポリヌクレオチド（すなわち、悪性細胞において変化したと考えられそうにないゲノムの一部）の少なくとも一部に相補的である単一のオリゴヌクレオチドプローブを結合させる。第2のセットのハイブリダイゼーションビーズのメンバーは、第1のセットのハイブリダイゼーションビーズのメンバーと区別されるサイズおよび色である。第1および第2のハイブリダイゼーションビーズはまた、他の特徴に基づいて区別され得る。例えば、ビーズは、それらの蛍光波長により区別される蛍光マーカートを有し得る。異なる電気化学的荷電を有するビーズもまた用いられ得る。ビーズを区別するために使用される正確な様相は、付着した第1のビーズと第2のビーズとの間の区別に基づいて、第1のプローブ

と第2のプロープとを区別することが可能である限り、必須ではない。

両方のセットのハイブリダイゼーションビーズを、ハイブリダイゼーション条件下でサンプルに曝し、それにより対照および標的へのハイブリダイゼーションを可能にする。次いで、サンプルを洗浄してハイブリダイズしていないビーズ／プロープの組み合わせを除去する。ハイブリダイズしていないビーズ／プロープの組み合わせは、例えば、プロープ配列に相補的な固定化DNAで裏打ちしたカラムにサンプルを通すことにより除去される。従って、二本鎖は通り抜けるが、任意のハイブリダイズしていないビーズ／プロープの組み合わせはカラム上に保持される。続いて、サンプルを、二本鎖を形成した第1および第2のハイブリダイ

ゼーションプロープを定量するために、ハイブリダイゼーションビーズを区別して計数するための手段に曝す。得られた数は、集団中の対照および標的のポリヌクレオチドのコピー数の正確な評価を提供する。なぜなら、区別した計数手段は、個々のビーズを計数するからである。1つのビーズは、1つのプロープに等しく、これは次いで、測定される核酸の1コピーを意味する。

区別して計数する手段の例は、インピーダンス測定装置（例えば、コールターカウンター（Coulter Electronics, Inc., Miami, Florida））である。サンプルを、それらの電流の区別されるインピーダンスを測定することにより、2つのタイプのハイブリダイゼーションビーズを区別して検出する装置に通過させる。あるいは、装置は、蛍光、色、または他のパラメーターを測定し得る。アッセイの速度を増大させるために、マルチオリフィス装置を用い得る。マルチオリフィスのインピーダンスカウンターを、図2に模式的に示す。マルチオリフィス配列を、電気伝導性の液体（例えば、生理食塩水）を充填したカラムの一端に置く。ハイブリダイズした標的セグメントまたは対照セグメントのいずれかを有するハイブリダイゼーションビーズを、カラムの反対側の末端に挿入する。それぞれのオリフィスは、1回に1つのハイブリダイゼーションビーズのみを収容するのに十分なだけ大きく、そして信頼性のあるインピーダンス測定を可能にするように十分に広い。電圧は、それぞれのオリフィスごとに横切って設定される。それぞれのハイブリダイゼーションビーズ（これは、非伝導性である）は、オリフィス

の1つを通過するにつれて、生理食塩水の容量と置き換わり、それによりそのサイズに応じたインピーダンスを生じる。次いで、これにより、ビーズのサイズと直接相関する測定可能な電流の減少を生じる。2つの異なるインピーダンス事象のそれぞれの数を集計することにより、ハイブリダイゼーションビーズ数の正確な評価、従って集団におけるそれぞれのタイプのプローブ数を得ることができる。

第1および第2のハイブリダイゼーションビーズの定量的測定に際し、データを分析して第1および第2のハイブリダイゼーションビーズの量の間の何らかの差が統計的に有意であるかどうかを決定し得る。対照に対する標的の量の減少は、サンプル中の細胞の亜集団における標的対立遺伝子の変異または欠失の指標である。p53遺伝子が標的対立遺伝子である場合、このような変異はガンまたは前

ガ  
ン条件の指標である。医師は、さらなる処置（例えば、内視鏡手順およびポリープ切除手順）を処方する根拠としてこのような結果を用い得る。

#### B. 単一塩基多型における変異の検出

上記の基本的な方法をまた、母系対立遺伝子と父系対立遺伝子との間の単一塩基多型部位でのヘテロ接合性または他の変異の消失を検出するために適用し得る。このような検出は、典型的に、より大きな欠失または他の変異の指標である。しかし、単一多型ヌクレオチドでの変異は、2つの対立遺伝子の1つにおいて遺伝子の機能を阻害するために必要なすべてであり得る。単一塩基多型領域における変異は、相補的再重複（reduplication）と呼ばれる最近発見された現象のために、検出するのが困難であり得る。相補的再重複において、特定の遺伝子座での2つの対立遺伝子の1つの消失は、残存する対立遺伝子の「再重複」をもたらす。再重複は、通常、残存する対立遺伝子を含む染色体上で起き、そして残存する対立遺伝子位置の非常に近接した染色体上に残存する対立遺伝子を1コピー以上生み出すことを含む。1つ以上の単一塩基多型（すなわち、遺伝子座におけるヘテロ接合性が、遺伝子座の1つ以上の領域における1対上の単一塩基の差違によって決定される）を示す遺伝子座の場合、相補的再重複は、残存する対立遺伝

子を含む染色体上への、欠失した配列に対応する配列の重複物の挿入をもたらす。最もストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でさえ、欠失した配列に対するプローブのいくつかは、単一塩基多型の遺伝子座で重複した配列に結合する。従って、このような環境では、欠失は検出され得ない。なぜなら、多型部位（すなわち、単一塩基多型に含まれる対立遺伝子領域）に結合したプローブの数の何らかの真の差違は、他の対立遺伝子の再重複領域に由来する増大により、不明確になり得るからである。

相補的再重複および非特異的プローブ結合に関連した問題は、一般に、本明細書中に記載の方法の実施により解消される。このような方法は、生物学的サンプル中に含まれる細胞の亜集団における特定の遺伝子座に存在する2つの対立遺伝子のうちの1つでの欠失の検出を可能にする。腫瘍抑制対立遺伝子を包含する多くの対立遺伝子は、一定の核酸領域に関して単一多型ヌクレオチドを含む。個体は、通常多型ヌクレオチドについてホモ接合またはヘテロ接合のいずれかであり

得る。多くの単一塩基多型ヌクレオチド部位が大部分の対立遺伝子に存在するので、所定の個体が少なくとも1つの単一塩基多型部位でヘテロ接合である可能性は高い。単一塩基多型部位（個体がここでヘテロ接合である）での2つのヌクレオチドのうちの1つにおける統計的に有意な減少は、この部位を含む対立遺伝子における欠失についてのマーカーとして使用され得る。

公知の単一塩基多型を含むゲノム領域は、ヌクレオチドデータベース（例えば、GenBank、EMBL、または任意の他の適切なデータベース）を対照することにより同定され得る。多型の存在は、本明細書中に教示される方法（ゲル電気泳動）により、または他の標準的な方法により決定され得る。発明の目的のために、単一塩基多型は、単一の多型ヌクレオチドがより大きな多型部位の一部を形成するか否かにかかわらず、対立遺伝子の非多型領域に隣接する単一の多型的なヌクレオチドであること（すなわち、単一塩基多型は、より大きなポリヌクレオチド多型の末端ヌクレオチドであり得る）を意図する。ガンの検出のためには、考えられる領域は、ヘテロ接合性の消失が有力である領域であり、例えば、腫瘍抑制遺伝子を含有する領域である。所定の個体は、任意の同定される単一塩基多型領域



において多型ポリヌクレオチドについてホモ接合性またはヘテロ接合性であり得る。従って、多くの単一塩基多型領域が同一である場合、少なくとも1つのヘテロ接合性単一塩基多型領域がサンプル中に見出される可能性は増大する。

一旦単一塩基多型部位が同定されると、この個体の正常（すなわち、非ガン性または非前ガン性）細胞においてDNAのどの部位がヘテロ接合性であるかを決定するために、患者から、例えば、血球からDNAサンプルを得る。次いで、糞便サンプルを上記のように調製する。サンプル中の二本鎖DNAを一本鎖DNAに変換する。次いで、両方の対立遺伝子に対するコーディング鎖または非コーディング鎖のいずれかをサンプルから取り出す。以下の考察から明らかであるように、本明細書中に開示した方法は、コーディング鎖または非コーディング鎖のいずれが試験されるかには無関係である。

単一塩基多型の一部に相補的であるオリゴヌクレオチドプローブを、構築する。この部分は、5'-3'（コーディング）鎖または3'-5'（非コーディング）鎖のいずれがテンプレートとして用いられたかにかかわらず、多型ヌクレオチドのすぐ

3'側であるヌクレオチドで終了する。図3は、上記の4つの可能なテンプレート鎖それぞれについて多型ポリヌクレオチドのすぐ3'側である4つの可能なプローブを示す（図3における配列は、仮想的であり、そして何らかの実際の配列を表すことを意図しない）。M1で標識した配列は配列番号1であり；M2で標識した配列は配列番号2であり；M3で標識した配列は配列番号3であり；M4で標識した配列は配列番号4であり；F1で標識した配列は配列番号5であり；F2で標識した配列は配列番号6であり；F3で標識した配列は配列番号7であり；そしてF4で標識した配列は配列番号8である。いずれの鎖もヘテロ接合性および/またはその消失を決定するためのプローブ結合のためのテンプレートとして用いられ得るが、テンプレートにハイブリダイズするプローブの配列は、用いた鎖によって異なる。プローブは、効率的でかつ特異的なハイブリダイゼーションを可能にする任意の長さであり得る。図3は、示した仮想的な配列へのハイブリダイゼーションに有用である4つの仮想的なプローブを単に例示するに過ぎない。プローブ配列の長さは、分析されるそれぞれのゲノム領域に適切のように

決定され得る。好ましい長さは、約10~約100ヌクレオチドの間である。プローブのサイズはまた、単一塩基多型を取り巻く領域（すなわち、もし存在するならば、多型の5'または3'側に隣接する領域）のサイズに依存する。オリゴヌクレオチドプローブの構築およびハイブリダイゼーションに関する詳細は、当該分野で公知である。

それぞれの多型領域に対する単一のプローブは、多型ヌクレオチドまで（しかしこれは含まない）の母系および父系の対立遺伝子の両方の領域にハイブリダイズする。多型ヌクレオチドは、ヘテロ接合体において母系および父系の対立遺伝子において異なる。図3は、多型ヌクレオチドを取り囲む領域のごく一部のみを示す。図3に示される対立遺伝子は、多型部位でヘテロ接合である。

プローブは、標準的な方法によってその特定のテンプレートDNAにハイブリダイズする。サンプルは、適宜洗浄され、ハイブリダイズしなかったプローブが除去され得る。プローブに結合したそれぞれの標的領域が、多型ヌクレオチドでヘテロ接合であるか、またはホモ接合であるかを決定するために、本明細書中に参考として援用される Sanger, Proc.Nat'l Acad. Sci. (USA), 74:5463-5467(19

77)に報告されるジデオキシチェンターミネーション法の変法を用いる。この方法は、4つの通常の2',3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸 (ddATP、ddCTP、ddGTP、およびddTTP) の少なくとも2つを用いる工程を包含する。異なる検出可能な標識を、当該分野で公知の方法によって、それぞれのジデオキシヌクレオシド三リン酸 (ddNTP) に結合させる。区別して標識されたddNTPは、例えば、Perkin Elmer Corporation(カタログ番号401456)から市販されている。次いで、少なくとも2つの標識されたddNTPを、上記のように母系および父系の対立遺伝子にハイブリダイズしたプローブを有するそれぞれのサンプルに曝す。どの2つのddNTPを用いるかの選択は、ヘテロ接合の多型部位でのヌクレオチドに依存する。3'改変がさらなる3'ヌクレオチドの結合（すなわち、プローブの伸長）を妨げず、そしてプローブの3'末端への改変ヌクレオチドの結合を阻害しない限り、この方法において任意の3'改変ヌクレオシド三リン酸を用い得る。DNAポリメラーゼ（例えば、Sequenase™ (Perkin-Elmer)）をサンプル混合物に添加する

。対立遺伝子鎖をプライマーとして用いると、ポリメラーゼはプローブの3'末端に1つのddNTPを添加し、取り込まれたddNTPは単一塩基多型部位に存在するヌクレオチドに相補的である。ddNTPは3'ヒドロキシルを有しないので、ハイブリダイズしたプローブのさらなる伸長は生じない。完了後、サンプルを洗浄して過剰なddNTPを除去する。次いで、標識を、それぞれのサンプルにおいて計数する。2つの区別して標識されたddNTPのサンプル中の存在は、多型部位でのヘテロ接合性の指標である。

ヘテロ接合性またはホモ接合性を確立するために、サンプル中のそれぞれの標識の存在量について決定する必要はない。例えば、区別して標識されたデオキシヌクレオシド三リン酸を、ヘテロ接合性またはホモ接合性の決定のために用い得る。2つの異なる標識されたジデオキシヌクレオチドがプローブに取り込まれるという事実だけで、分析されるべき単一塩基多型部位がヘテロ接合性であることを意味する。しかし、患者がどの部位で多型であるかの決定は、ガンの指標であり得る多型部位における変化を検出するために今後の試験に使用され得る、多型のベースラインを確立するために有用である。多型の存在を、本明細書中に教示した方法により、ゲル電気泳動により、または他の標準的な方法により決定し得る。

多型部位にヘテロ接合が存在する場合、2つの区別して標識されたddNTPのそれぞれの量を計数することにより、サンプル中の細胞の亜集団においてヘテロ接合性の消失（すなわち、欠失）が存在するか否かの決定が可能となる。単一塩基多型部位でヘテロ接合である細胞を含有する正常（すなわち、非ガン性）サンプルにおいて、プローブに添加された2つのddNTPのそれぞれの検出量が、（統計的有意差の選択限界内で）等しいことが期待される。しかし、サンプル中の亜集団において2つの対立遺伝子の1つに欠失が起きた場合、取り込まれた（標識された）ddNTPを介して検出される2つの対立遺伝子のそれぞれの量の間に、統計的有意差が存在する。このような差の検出は、サンプル内のゲノムの不安定性の指標である。このようなゲノムの不安定性は、サンプル中のガン細胞または前ガン細胞の可能性を示す。

ddNTPが実際に付着した対立遺伝子を計数する能力を改良するために、上記のように、異なるサイズのハイブリダイゼーションタイプのビーズを用いてddNTPを標識する。標識されたddNTPを含むプローブと結合した対立遺伝子を、上記のように、計数装置（例えば、コールターカウンター）を用いて計数する。また、上記のように、区別した蛍光標識または他の計数手段を、取り込まれたddNTPを別々に検出するために用い得る。

単一塩基多型部位でのヘテロ接合性の検出およびヘテロ接合性の消失の検出を、異なる工程において決定し得る。例えば、プローブを、上記のように多型であると決定されたヌクレオチドのすぐ隣だがこれに含まれない部分にハイブリダイズさせ得る。次いで、4つのddNTPをサンプルに添加し得、洗浄し得、そしてそれぞれの標識の存在または非存在を検出し得る。1つの標識のみが検出されるということは、サンプルを得た個体が潜在的に多型のヌクレオチドのその部位においてホモ接合であることを示す。2つの標識の検出は、個体がヘテロ接合であることを意味する。ヘテロ接合の遺伝子座を記録する。上記で留意したように、ヘテロ接合性のベースラインの決定を、標準的な方法を用いて行い得る。一旦ベースラインが確立されたら、ヘテロ接合性の消失を検出するためにヘテロ接合性を探索して、個体に対して今後の試験が行われる。ガンの検出のために、ヘテロ接合

の遺伝子座が、典型的に、腫瘍抑制遺伝子（p53、dcc、apcなどを包含する）を含む染色体領域である。本明細書中に記載の方法を用いて、ヘテロ接合性の腫瘍抑制遺伝子座の「フィンガープリント」が構築され得る。フィンガープリントからの今後の異常（すなわち、欠失）は、ガンの発達についての有益な情報を提供する。

前記の方法の好ましい使用は、結腸ガンの検出にある。代表的な糞便サンプルを、上記のように調製する。二本鎖DNAを一本鎖DNAに変換し、そして検出されるべき鎖の相補物をサンプルから除去する。残存する一本鎖DNAを、ガンに関連する対立遺伝子における公知の単一塩基多型の基礎に基づいて設計された多数コピーのプローブに曝し、上記のように、プローブを、多型ヌクレオチドにすぐ隣接

する所望の数のヌクレオチドとハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションが完了した後、サンプルを洗浄しそして区別して標識されたddNTPおよびDNAポリメラーゼに曝す。次いで、サンプルを洗浄して取り込まれなかったddNTPを除去する。何らかの標識されたddNTPの存在を決定する。2つの標識が検出された場合、サンプルを得た個体は多型ヌクレオチドでヘテロ接合である。遺伝子座のヘテロ接合性および多型対立遺伝子にすぐ隣接する部位に適合するプローブ配列は、ヘテロ接合性の消失について今後の試験する際の参考として注目される。あるいは、一旦患者が遺伝子座でヘテロ接合であると決定されたら、サンプル中の細胞の亜集団におけるヘテロ接合性の消失の存在を決定するために、上記の方法でアッセイが直ちに行われ得る。

#### C. マイクロサテライトの不安定性の分析

マイクロサテライトは、ゲノムを通して見出されるジヌクレオチドまたはトリヌクレオチドの反復である。特定の配置のマイクロサテライト反復は、しばしば特定のゲノム配列と関連し、そして正常な条件下で安定的に遺伝する。「マイクロサテライトの不安定性」と言われるマイクロサテライトのコピー数の拡大は、典型的にミスマッチ修復の欠損に関連する。従って、マイクロサテライト領域の変化は、患者が他のゲノム領域での変異する危険性があることを示す。

ガン関連遺伝子における変異の指標としてマイクロサテライトの不安定性を検出するためには、まず目的の遺伝子と関連するマイクロサテライト領域を同定し

なければならない。このような領域は、典型的にはデータベース（例えば、GenBank、EMBLなど）で同定される。一旦、例えば、p53腫瘍抑制遺伝子に関連する野生型マイクロサテライト領域が同定されたら、マイクロサテライト領域およびマイクロサテライト領域のすぐ5'側およびすぐ3'側の領域に広がるオリゴヌクレオチドプローブを構築する。正確な長さのプローブを、実験者により決定し得る。マイクロサテライトが関連する母系および父系の対立遺伝子（例えば、p53）の両方において、5'および3'側に広がる部分を含むマイクロサテライト領域にハイブリダイズするプローブを構築する。

体組織または体液の適切なサンプルを得て、そして本明細書中に記載のように

処理する。二本鎖DNAを変性させ、そして過剰な母系および父系のプローブを上記のようにハイブリダイゼーション条件下でサンプル中に導入する。プローブを、上記のように検出可能に標識する。検出されるべき鎖の相補物を、上記の方法により適宜除去し得る。次いで、サンプルを洗浄してハイブリダイズしていないプローブを除去し、そしてハイブリダイズしたプローブの量を定量的に検出する。

定量的検出を、本明細書中に記載の任意の手段により達成し得る。例えば、プローブを、母系対立遺伝子に付着するプローブが、あるサイズのビーズに付着し、そして父系対立遺伝子に結合するプローブが第1のサイズのビーズから区別され得る第2のサイズのビーズに結合するように、ハイブリダイゼーションビーズに付着させ得る。付着したプローブを有するビーズを、上記のように計数し得る。

母系対立遺伝子に結合しているプローブの量と、父系対立遺伝子に結合しているプローブの量との間の統計的有意差の検出は、マイクロサテライトの不安定性の指標である。以前に述べたように、マイクロサテライトの不安定性は、マイクロサテライトが存在する遺伝子座での変異の指標であり得る。マイクロサテライト領域が腫瘍抑制遺伝子またはガン遺伝子と関連する場合、生物学的サンプル中の細胞の亜集団における対立遺伝子におけるマイクロサテライトの不安定性の検出は、ガンの可能性あるいはガンまたは前ガンが既に発達している可能性の指標である。次いで、本明細書中に記載したように、（侵襲的手段または非侵襲的手段のいずれかにより）さらなる試験を行い得る。

別の実施態様において、マイクロサテライトの「フィンガープリント」を、患者から得たサンプルにおけるガンの原因遺伝子に関連する領域から採取する。このようなフィンガープリントは、標準的な方法により得られ得る。フィンガープリントは、ガンの原因遺伝子（単数または複数）に関連する野生型マイクロサテライトの配列を含む。一旦得たら、ガンの発達と関連し得るマイクロサテライト領域における変化（すなわち、マイクロサテライト不安定性）をモニターするために、フィンガープリントを保存し、そして将来の同じ患者由来のサンプルの試

験で使用する。マイクロサテライトの長さおよび／または配列における経時変化を、その病因における初期段階でガン組織を検出および除去するために、さらなる試験および／または処置を処方するために使用し得る。

以下の請求の範囲を考慮すれば、本発明のさらなる実施態様が明らかである。

## 配列表

## (1) 一般的情報:

## (i) 出願人:

- (A) 名称: エグザクト ラボラトリーズ, インコーポレイテッド
- (B) 番地: オールド エバーグリーン 12
- (C) 市: ベッドフォード
- (D) 州: ニューハンプシャー
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号: 03110
- (G) 電話:
- (H) テレファックス:
- (I) テレックス:

## (ii) 発明の名称: 糞便サンプルから結腸ガンを検出する方法

## (iii) 配列数: 8

## (iv) 連絡住所:

- (A) 名称: パテント アドミニストレイター, テスタ, ハーウィッツ アン  
ド チボルト, エルエルピー
- (B) 番地: ハイ ストリート 125
- (C) 市: ボストン
- (D) 州: マサチューセッツ
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号: 02110

## (v) コンピューター読み出し形態:

- (A) 媒体型: フロッピー ディスク
- (B) コンピューター: IBM PC 互換用
- (C) OS: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.30

## (vi) 現在の出願データ:

- (A) 出願番号:
- (B) 出願日:
- (C) 分類:

## (viii) 代理人/事務所情報:

- (A) 氏名: メイアーズ, トーマス シー
- (B) 登録番号: 36,989



(C)照会／記録番号：EXT-002PC

(ix)電話回線情報：

(A)電話：(617) 248-7000

(B)テレファックス：(617) 248-7100

(2)配列番号1の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：9塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_feature

(B)存在位置：1..9

(D)他の情報：/注＝「M1」

(xi)配列：配列番号1：

GGCATCGCA

9

(2)配列番号2の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：19塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_feature

(B)存在位置：1..19

(D)他の情報：/注＝「M2」

(xi)配列：配列番号2：

ATCGGCTTAC TCGGATGCC

19

(2)配列番号3の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：19塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_feature

(B)存在位置：1..19

(D)他の情報：/注＝「M3」

(xi)配列：配列番号3：

GGCATCGCAG TAAGCCGAT

19

(2)配列番号4の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：9塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_feature

(B)存在位置：1..9

(D)他の情報：/注＝「M4」

(xi)配列：配列番号4：

ATCGGCTTA

9

(2)配列番号5の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：9塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_feature

(B)存在位置：1..9

(D)他の情報：/注＝「F1」

(xi)配列：配列番号5：

GGCATCGCA

9

(2)配列番号6の情報：

(i)配列の特徴：

(A)長さ：19塩基対

(B)型：核酸

(C)鎖の数：一本鎖

(D)トポロジー：直鎖状

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：misc\_feature

(B)存在位置：1..19

(D)他の情報：/注＝「F2」

(xi)配列：配列番号6：

ATCGGCTTAT TGCGATGCC

19

## (2) 配列番号7の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 19 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: misc\_feature
- (B) 存在位置: 1..19
- (D) 他の情報: /注 = 「F3」

## (xi) 配列: 配列番号7:

GGCATCGCAA TAAGCCGAT

19

## (2) 配列番号8の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 9 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ix) 配列の特徴:

- (A) 特徴を表す記号: misc\_feature
- (B) 存在位置: 1..9
- (D) 他の情報: /注 = 「F4」

## (xi) 配列: 配列番号8:

ATCGGCTTA

9

【図1】

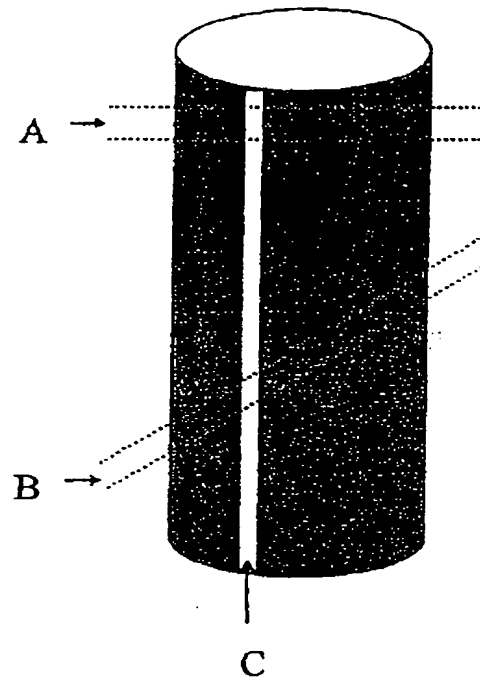


FIG. 1

【図2】

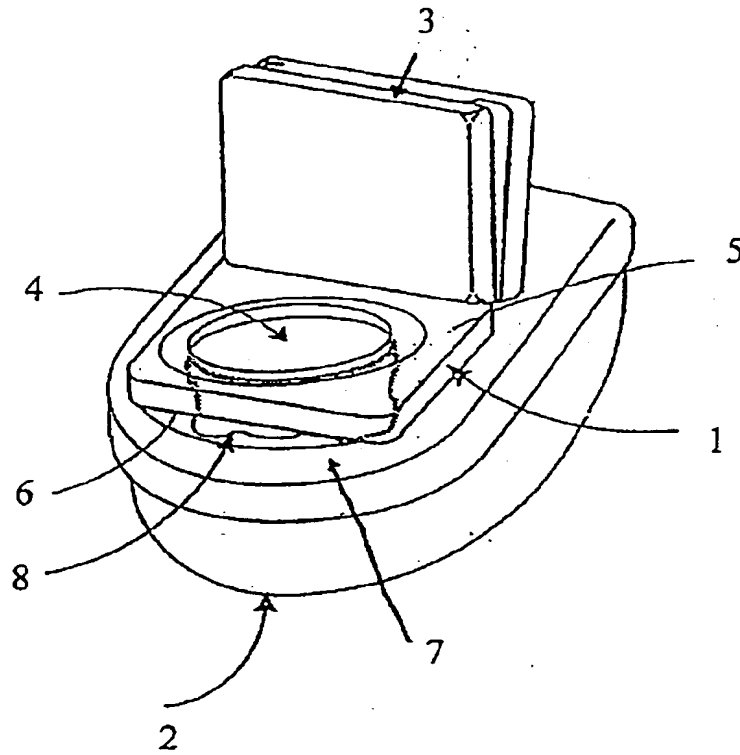


FIG. 2

【図3】

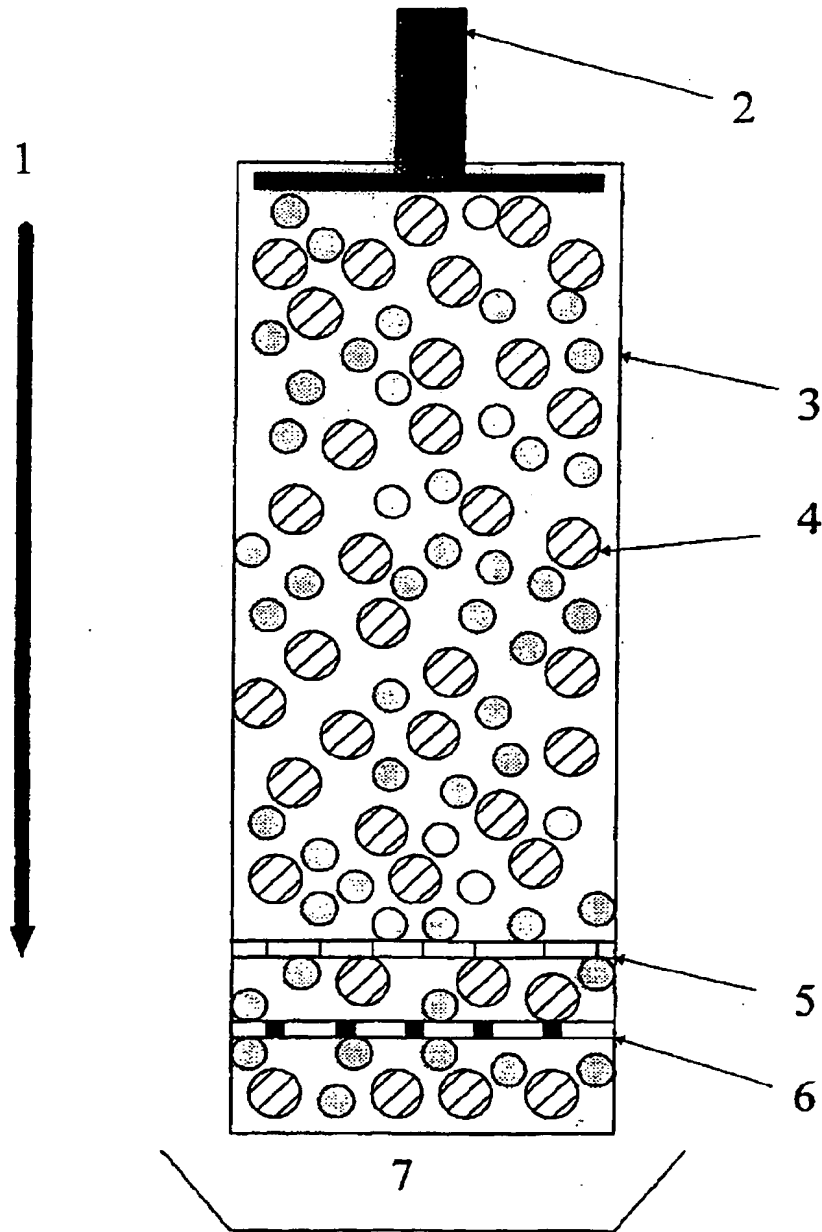


FIG. 3

【図4】

1: 3'ACGCTACGG5'  
2: 5'....ATCGGCTTACTGCGATGCC....3'

M

3: 3'....TAGCCGAATGACGCTACGG....5'  
4: 5'ATCGGCTTA3'

1: 3'ACGCTACGG5'  
2: 5'....ATCGGCTTATTGCGATGCC....3'

F

3: 3'....TAGCCGAATAACGCTACGG....5'  
4: 5'ATCGGCTTA3'

FIG. 4

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 96/20727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/574 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9236 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 92-296108 XP002032395 & JP 04 203 966 A (YUKEN YG) , 24 July 1992 see abstract	1,2
A	WO 92 14157 A (BAHAR KAMAL) 20 August 1992  see the whole document & US 5 380 547 A cited in the application	1,2,4,6, 8,9
A	WO 91 09964 A (UNIV JOHNS HOPKINS) 11 July 1991 see the whole document ---	1-5,9, 10,12
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document members of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  5 June 1997		Date of mailing of the international search report  24.06.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340 2040, Tlx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340 3016		Authorized officer  Ceder, O



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No  
PCT/US 96/20727

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 352 775 A (ALBERTSEN HANS ET AL) 4 October 1994 cited in the application see abstract; claims -----	5,10,12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 96/20727

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9214157 A	20-08-92	CA 2101943 A	06-08-92
		EP 0571539 A	01-12-93
		JP 7500411 T	12-01-95
		US 5380647 A	10-01-95
WO 9109964 A	11-07-91	AU 649431 B	26-05-94
		AU 7158591 A	24-07-91
		CA 2073186 A	05-07-91
		EP 0507852 A	14-10-92
		JP 5508307 T	25-11-93
		US 5532108 A	02-07-96
		US 5602243 A	11-02-97
		US 5561223 A	01-10-96
US 5352775 A	04-10-94	AU 1366992 A	27-08-92
		EP 0569527 A	18-11-93
		WO 9213103 A	06-08-92

---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L  
U, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(72)発明者 シュバー, アンソニー ビー,  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
01757, ミルフォード, グラント ストリ  
ート 11

(72)発明者 アルマー, ケビン エム,  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02025, コハセット, マージン ストリー  
ト 30

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
【部門区分】第6部門第1区分  
【発行日】平成16年11月4日(2004.11.4)

【公表番号】特表2002-515973(P2002-515973A)  
【公表日】平成14年5月28日(2002.5.28)  
【出願番号】特願平9-527625  
【国際特許分類第7版】

G 0 1 N 33/574

G 0 1 N 33/53

【F I】

G 0 1 N 33/574 E

G 0 1 N 33/53 M

【手続補正書】

【提出日】平成15年11月28日(2003.11.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 手続補正書

平成15年11月28日

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

平成9年特許願第527625号



## 2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01752, マールボロー,  
キャンパス ドライブ 100

名称 エグザクト サイエンシース コーポレイション

## 3. 代理人

住所 〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 弁理士 山本 秀策



電話 (大阪) 06-6949-3910

## 4. 補正対象書類名

請求の範囲

## 5. 補正対象項目名

請求の範囲

## 6. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正します。

方式  
審査

### 請求の範囲

1. 生物学的サンプルにおける疾患マーカーの存在をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- a) 該患者より排泄された糞便の代表部分を含むサンプルを得る工程；および
  - b) 該疾患マーカーの存在を決定するために、該部分についてアッセイを行う工程；
- を包含する方法。

2. 前記部分が、糞便の円周表面の部分である、請求項1に記載の方法。

3. 前記部分が、糞便の横断面の部分である、請求項1に記載の方法。

4. 前記疾患マーカーが、前記サンプルが得られた患者におけるガンまたは前ガンを示唆する、請求項1に記載の方法。

5. 前記糞便が、円周表面を含む外層を有し、そして前記サンプルを得る工程が、該糞便から該外層を抽出する工程を包含し、そして該サンプルは、該外層の少なくとも部分である、請求項1に記載の方法。

6. 患者における結腸直腸のガン病巣または前ガン病巣の存在をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- a) 該患者より排泄された糞便の円周表面を含むサンプルを得る工程；および
  - b) 該病巣の存在を示唆する特徴を該サンプル中で検出するためのアッセイを行う工程；
- を包含する、方法。

7. 患者における結腸直腸のガン病巣または前ガン病巣の存在をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- a) 該患者より排泄された糞便を得る工程；
  - b) 該糞便から円周表面を取り出す工程；および
  - c) 該糞便に流出された細胞または細胞破片の存在を示唆する特徴を検出するために、該円周表面についてアッセイを行い、それによって該病巣の示唆について該糞便をスクリーニングする工程；
- を包含する方法。

8. 患者における結腸直腸のガン病巣または前ガン病巣の存在をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- a) 該患者より排泄された糞便の少なくとも横断面を含むサンプルを得る工程；および
  - b) 該病巣から該排泄された糞便に流出された細胞または細胞破片の存在を示唆する特徴を該サンプル中で検出するためのアッセイを行う工程；
- を包含する方法。

9. 患者における結腸直腸のガン病巣または前ガン病巣の存在をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- a) 該患者より排泄された糞便を得る工程；
  - b) 該糞便から横断面を取り出す工程；および
  - c) 該病巣から該排泄された糞便に流出された細胞または細胞破片の存在を示唆する特徴を該横断面で検出するために、該横断面についてアッセイを行う工程；
- を包含する方法。

10. 結腸上皮の円周から脱落した細胞および細胞破片を含む糞便サンプルにおいて結腸直腸ガンの示唆をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

- a) 患者より排泄された糞便の横断面部分を含むサンプルを得る工程；および
- b) ガン病巣または前ガン病巣から該排泄された糞便に流出された細胞または細胞破片の存在を検出するためのアッセイを行う工程；

を包含する方法。

1 1. 糞便中の結腸直腸ガンの示唆についてスクリーニングする方法であって、以下の工程：

糞便の横断面から得られたサンプル中で、ガン病巣または前ガン病巣から排泄された糞便に流出された細胞または細胞破片を検出するためのアッセイを行う工程、

を包含する、方法。

1 2. 糞便中の結腸直腸ガンの示唆についてスクリーニングする方法であって、以下の工程：

糞便の円周表面から得られたサンプル中で、ガン病巣または前ガン病巣から排泄された糞便に流出された細胞または細胞破片を検出するためのアッセイを行う工程、

を包含する、方法。

1 3. 前記アッセイが、前記病巣を含む形質転換された細胞のクローン集団由来の破片を検出する、請求項6、7、8、9、10、11、または12に記載の方法。

1 4. 前記アッセイが、前記形質転換細胞のクローン集団の存在を示唆する、該形質転換された細胞により発現されるタンパク質を検出する、請求項13に記載の方法。

1 5. 前記アッセイが、前記形質転換細胞のクローン集団の存在を示唆するDNAの特徴を検出する、請求項13に記載の方法。

1 6. 前記DNAの特徴が変異である、請求項15に記載の方法。



17. 前記変異が、ヘテロ接合性の消失およびマイクロサテライトの不安定性からなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

18. 前記特徴が、腫瘍抑制対立遺伝子における欠失を含む、請求項15に記載の方法。

19. 前記特徴が、多型遺伝子座を含むヘテロ接合性の消失を含む、請求項15に記載の方法。

20. 工程(b)の前に、前記サンプルを生理学的に適合可能な緩衝液に均一化する工程をさらに包含する、請求項6、8、10、11、または12に記載の方法。

21. 前記生理学的に適合可能な緩衝液が、界面活性剤およびプロテイナーゼを含有する、請求項20に記載の方法。

22. 工程(b)の前に、前記円周表面を生理学的に適合可能な緩衝液に均一化する工程をさらに包含する、請求項7に記載の方法。

23. 前記生理学的に適合可能な緩衝液が、界面活性剤およびプロテイナーゼを含有する、請求項22に記載の方法。

24. 工程(b)の前に、前記横断面を生理学的に適合可能な緩衝液に均一化する工程をさらに包含する、請求項9に記載の方法。

25. 前記生理学的に適合可能な緩衝液が、界面活性剤およびプロテイナーゼを含有する、請求項24に記載の方法。

26. 前記アッセイが、前記病巣から流出されたガン胎児性抗原の存在を検出す

る、請求項6、7、8、9、10、11、または12に記載の方法。

27. 前記アッセイが、前記サンプルを、前記病巣の存在に特徴的な分子に特異的に結合する抗体に曝す工程を包含する、請求項6、8、10、11、または12に記載の方法。

28. 前記アッセイが、前記円周表面を、前記病巣の存在に特徴的な分子に特異的に結合する抗体に曝す工程を包含する、請求項7に記載の方法。

29. 前記アッセイが、前記横断面を、前記病巣の存在に特徴的な分子に特異的に結合する抗体に曝す工程を包含する、請求項9に記載の方法。

30. 前記アッセイが、前記サンプルにおいて、該サンプル中の細胞の亜集団において変異することが知られているか、または推測される第1の対立遺伝子の数Xと、該サンプル中の細胞の亜集団において変異しないことが知られているか、または推測される第2の対立遺伝子の数Yとの間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、統計的有意差の存在が、該サンプル中の細胞の亜集団における変異およびガン病巣または前ガン病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項6、8、10、11、または12に記載の方法。

31. 前記アッセイが、以下の工程：

a) 前記サンプルにおける多型遺伝子座での母系対立遺伝子の量を検出する工程；

b) 該サンプルにおける該多型遺伝子座での父系対立遺伝子の量を検出する工程；および

c) 該母系対立遺伝子の量と該父系対立遺伝子の量との間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、

統計的有意差の存在が、該サンプル中の細胞の亜集団における該多型遺伝子座での欠失および病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項30に記載の方法。

3 2. 前記アッセイが、前記円周表面において、該円周表面中の細胞の亜集団において変異することが知られているか、または推測される第1の対立遺伝子の数Xと、該円周表面中の細胞の亜集団において変異しないことが知られているか、または推測される第2の対立遺伝子の数Yとの間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、統計的有意差の存在が、該円周表面中の細胞の亜集団における変異およびガン病巣または前ガン病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項7に記載の方法。

3 3. 前記アッセイが、以下の工程：

a) 前記円周表面における多型遺伝子座での母系対立遺伝子の量を検出する工程；

b) 該円周表面における該多型遺伝子座での父系対立遺伝子の量を検出する工程；および

c) 該母系対立遺伝子の量と該父系対立遺伝子の量との間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、

統計的有意差の存在が、該円周表面中の細胞の亜集団における該多型遺伝子座での欠失および病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項3 2に記載の方法。

3 4. 前記アッセイが、前記横断面部分において、該横断面中の細胞の亜集団において変異することが知られているか、または推測される第1の対立遺伝子の数Xと、該横断面中の細胞の亜集団において変異しないことが知られているか、または推測される第2の対立遺伝子の数Yとの間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、統計的有意差の存在が、該横断面中の細胞の亜集団における変異およびガン病巣または前ガン病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項9に記載の方法。

3 5. 前記アッセイが、以下の工程：

a) 前記横断面における多型遺伝子座での母系対立遺伝子の量を検出する工程；

b) 該横断面における該多型遺伝子座での父系対立遺伝子の量を検出する工程；および

c) 該母系対立遺伝子の量と該父系対立遺伝子の量との間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、

統計的有意差の存在が、該横断面中の細胞の亜集団における該多型遺伝子座での欠失および病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項 3 4 に記載の方法。

3 6. 前記アッセイが、前記サンプル中の標的腫瘍抑制対立遺伝子の数と、該サンプル中のガンに関連しない対照対立遺伝子の数との間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、統計的有意差の存在が、該サンプル中の細胞の亜集団における該標的腫瘍抑制対立遺伝子の欠失およびガン病巣または前ガン病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項 6、8、10、11、または 12 に記載の方法。

3 7. 前記アッセイが、前記円周表面中の標的腫瘍抑制対立遺伝子の数と、該円周表面中のガンに関連しない対照対立遺伝子の数との間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、統計的有意差の存在が、該円周表面中の細胞の亜集団における該標的腫瘍抑制対立遺伝子の欠失およびガン病巣または前ガン病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項 7 に記載の方法。

3 8. 前記アッセイが、前記横断面中の標的腫瘍抑制対立遺伝子の数と、該横断面中のガンに関連しない対照対立遺伝子の数との間に差異が存在するか否かを決定する工程を包含し、統計的有意差の存在が、該横断面中の細胞の亜集団における該標的腫瘍抑制対立遺伝子の欠失およびガン病巣または前ガン病巣の潜在的な存在を示唆する、請求項 9 に記載の方法。

3 9. 陽性のアッセイ結果を示す患者の結腸の視覚的試験を行うさらなる工程を包含する、請求項 6、7、8、9、10、11、または 12 に記載の方法。

4 0. 集団における結腸直腸ガンの罹患率を減少させるための方法であって、以

下の工程：

a) 患者により排泄された糞便の少なくとも横断面または円周表面を含むサンプルを得る工程；

b) 病巣から該排泄された糞便に流出された細胞破片の存在を該サンプル中で検出するためのアッセイを行う工程；および

c) 該アッセイにおいて陽性の結果を示す患者の結腸の視覚的試験を行って、病巣の存在を検出する工程；  
を包含する、方法。

4 1. 検出された病巣を外科的に切除するさらなる工程を包含する、請求項 4 0 に記載の方法。

4 2. 前記アッセイが、前記病巣を含む形質転換された上皮細胞のクローン集団から流出された破片の部分においてDNAの消失を検出する、請求項 4 0 に記載の方法。

4 3. その後の外科的除去のための病巣を同定するための、請求項 4 0 に記載の方法の使用。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**